CE 0483

SeroELISA™ Chlamydia TRUE IgM™

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para la detección de anticuerpos específicos IgM de Chlamydia en suero humano

Manual de instrucciones

Kit de 96 deteminaciones (Nº de catálogo 112-01)
Para uso exclusivo de diagnóstico in vitro.
Exclusivamente para uso professional
Guardar a 2-8ºC. **No congelar.**

Savyon® Diagnostics Ltd.
3 Habosem St. Ashdod 77610
ISRAEL
Tel: +972.8.8562920
Fax: +972.8.8523176
E-mail:support@savyondiagnostics.com

Uso previsto
El kit de SeroELISA™ Chlamydia TRUE™ IgM se usa para la determinación de anticuerpos específicos IgM contra Chlamydia en muestras humanas de suero por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).
Sólo para uso en diagnóstico *in vitro.*

Introducción

Chlamydia es una bacteria intracelular Gram-negativa que causa enfermedades agudas y crónicas en mamíferos y aves. El género Chlamydia comprende cuatro especies: *C. trachomatis, C. pneumoniae, C. psittaci* y *C. pecorum.*
C. trachomatis se divide en 15 serovariedades (1). Las serovariedades A, B, Ba y C causan tracoma (2), causa predominante de la ceguera prevenible en países endémicos del tercer mundo. Las serovariedades L_1-L_3, son agentes del linfogranuloma venéreo. Las serovariedades D-K son la causa más común de enfermedades genitales transmitidas sexualmente en todo el mundo: cervicitis, endometritis/ salpingitis (3) en mujeres y uretritis (4) en ambos sexos. La endometritis/salpingitis puede conducir a una oclusión tubal que conlleva un riesgo mayor de embarazos extrauterinos e infertilidad. La infección genital puede causar infección aguda o persistente sin síntomas clínicos. Generalmente, estas infecciones son tratables una vez diagnosticadas. Sin tratamiento, estas infecciones progresarían a inflamación crónica severa que conduciría infertilidad, embarazos ectópicos, aborto inducido o parto precoz. Los bebés infectados durante el parto podrían desarrollar conjuntivitis y neumonía (5).
C. pneumoniae es un importante patógeno respiratorio en humanos, causante de más del 10% de casos de neumonía. Se asocia con numerosas patologías respiratorias agudas como neumonía, asma, bronquitis, faringitis, síndrome respiratorio agudo con anemia falciforme, enfermedad coronaria cardíaca y síndrome de Guillain-Barré (6).
C. psittaci puede infectar a diversos tipos de especies hospedadoras: moluscos, aves o mamíferos y también causa neumonía severa.
Los tests serodiagnósticos, basados en marcadores inmunológicos específicos, sirven como herramienta diagnóstica no invasiva en la identificación de infecciones distales y profundas (7). Se ha encontrado que el anticuerpo IgM anti-Chlamydia tiene valor diagnóstico en la neumonía causada por *C. pneumoniae* (TWAR) y *C. psitacci* (8). La pauta serológica de IgM anti-Chlamydia en neumonitis clamidial es: se producen anticuerpos en los primeros estadíos de la infección, alcanzan su máximo valor después de 1-2 semanas y suelen decrecer gradualmente hasta valores indetectables en 2-3 meses (11).
Esta pauta se ha observado en el 20-50% de los pacientes nacidos de madres cuyo cultivo era positivo para *Chlamydia trachomatis* y/o con niveles elevados de anticuerpos IgG e IgA específicos contra Chlamydia. Estos niños desarrollaron neumonitis clamidial durante los primeros 6 meses de vida (7).
Dado que la IgM aparece sólo en infección aguda o reciente (9), el test IgM de Chlamydia requiere de una única muestra de suero y los resultados se reportarán como presencia o ausencia de IgM.
Altos títulos de IgG, que compiten por los mismos sitios antigénicos que la IgM, pueden producir falsos negativos para IgM. El factor reumatoide (Rf, actividad autoinmune) puede originar falsos positivos para IgM (10). Es por tanto imprescindible la eliminación de IgG y Rf para llevar a cabo el ensayo de detección de IgM.
El test SeroELISA™ de Chlamydia usa la serovariedad L_2 que reacciona con el antígeno de *C. trachomatis*. Este test detectará anticuerpos de *C. trachomatis, C. psittaci* y *C. pneumoniae* (TWAR).

Principio del ensayo

- El suero humano a testar se podrá en contacto con material antigénico recubriendo los pocillos. En caso de que los anticuerpos estén presentes en el suero del paciente, éstos se unirán a los antígenos en fase sólida formando un complejo y el resto de los componentes serán eliminados durante la fase de lavado.
- La peroxidasa de rábano picante (HRP) conjugada con anticuerpo anti-IgM humana (cadena μ-específica) se adiciona a los pocillos. Si en el paso previo se formó un complejo antígeno-anticuerpo, la peroxidasa conjugada con el anticuerpo anti-IgM se unirá al anticuerpo del complejo. Si no se formó ningún complejo antígeno-anticuerpo en el paso previo, el conjugado será eliminado durante la fase de lavado.
- Se adiciona sustrato TMB. Si la reacción es positiva, se origina un color azul en los pocillos al que sigue una reacción enzimática entre la peroxidasa, el peróxido y el cromógeno. Una vez se ha detenido la reacción enzimática mediante adición de solución ácida, se mide la absorbancia en los pocillos, usando un espectofotómetro a 450 nm.
- La absorbancia a 450 nm es indicativa de la concentración de anticuerpos IgM anti-Chlamydia en el suero de los pacientes.

Procedimiento del ensayo

1. Antígeno de Chlamydia unido a la fase sólida (Ag) + Suero positivo para IgM anti-Chlamydia (Ac_1)

↓

Complejo $AgAc_1$

2. Complejo $AgAc_1$ + Conjugado de anticuerpo anti-IgM humana con HRP (Ac_2)

↓

Complejo $AgAc_1Ac_2$

3. Complejo $AgAc_1Ac_2$ + Sustrato TMB

↓

Solución azul

↓ ← Solución de parada

Cromógeno

Solución amarilla

(Determinación de la absorbancia a 450 nm)

Advertencias y precauciones

- **Advertencia**: EL MATERIAL ANTIGÉNICO CHLAMIDIAL HAS SIDO INACTIVADO POR LO QUE NO CONTIENE ORGANISMOS VIVOS DETECTABLES. EN CUALQUIER CASO, LAS TIRAS DEBEN SER TRATADAS E ELIMINADAS COMO SI SE TRATARA DE MATERIAL POTENCIALMENTE INFECCIOSO.
  Precauciones: este kit contiene suero humano testado según las técnicas aprobadas de la FDA, y confirmado negativo para el antígeno de HBV y los anticuerpos de HCV, HIV-1 y HIV-2. Ningún método puede asegurar que los productos derivados de sangre humana no transmitan infecciones, todos los componentes derivados de sangre humana suministrados con este kit deben ser manejados como suero o sangre potencialmente infecciosos de acuerdo con las recomendaciones publicadas en el manual de CDC/NIH "Bioseguridad en Laboratorios Microbiológicos y Biomédicos, 1988".
- La solución cromógeno/sustrato es un material irritante para la piel y las mucosas membranosas. Evite el contacto directo.
- **Uso para diagnóstico in vitro exclusivamente.**

Contenido del kit

1. Microplaca titulada recubierta (96 pocillos por placa). Cada envase contiene una microplaca con 12 tiras que se pueden quitar sobre la estructura plástica soporte de la placa. Cada tira está recubierta con antígenos de Chlamydia.
   1 Unidad
2. Control positivo (suero humano positivo para anticuerpo IgM de Chlamydia). Listo para usar.
   1 Vial, 2,0 ml
3. Control negativo (suero humano negativo para anticuerpo IgM de Chlamydia). Listo para usar.
   1 Vial, 2,0 ml
4. Conjugado de anti-IgM humana (cadena μ-específica) con HRP. Listo para usar.
   1Vial, 10 ml
5. Diluyente de muestras IgM.
   1 Botella, 60 ml
6. Solución de lavado concentrada (x20)
   1 Botella, 100 ml
7. Sustrato TMB. Listo para usar.
   1 Vial, 14 ml
8. Solución de parada (H_2SO_4 1M). Listo para usar.
   1 Botella, 15 ml
9. Tapa para placa.
   1 Unidad
10. Manual de instrucciones **1**

Materiales requeridos no suministrados

1. Tubos perfectamente limpios para la dilución del suero de los pacientes.
2. Micropipetas ajustables, o pipetas multicanal (rangos de 5-50, 50-200 y 200-1000 µl) y puntas desechables.
3. Pipetas de plástico desechables (diferentes tamaños) y dispositivos de seguridad para pipetear.
4. Frasco volumétrico de un litro.
5. Cilindro volumétrico de 50 ml.
6. Lavador de la placa de ELISA o botella de lavado.
7. Toallas de papel o papel adsorbente.
8. Mezclador Vórtex.
9. Baño de agua a 37ºC con tapa o cámara húmeda metida dentro de un incubador a 37 ± 1ºC.
10. Lector de ELISA con filtro de 450 nm.
11. Agua destilada o doblemente desionizada para la solución de lavado tamponada concentrada.

Almacenamiento y estabilidad de los reactivos

Todos los materiales suministrados deben ser guardados a 2-8ºC. Si se guardan a una temperatura entre 2 y 8ºC, los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit. La exposición de componentes sellados a temperatura ambiente durante unas horas no causa daño a los reactivos. **¡NO CONGELE!**
Una vez el kit está siendo usado, su estabilidad es de 60 días desde el día de apertura por primera vez. Una vez abierto, la envoltura de aluminio que contiene las tiras debe cerrarse con celo. No debe tirarse la bolsa con agente desecante.

Recogida de muestras

Las muestras séricas deben tomarse en condiciones asépticas y almacenarse a 2-8ºC usando azida sódica (NaN_3) al 0,05% como conservante si se van a usar a los pocos días. Para períodos prolongados, las alícuotas de muestras séricas deben almacenarse a -20ºC.
Debido a que las muestras séricas turbias o hemolíticas dan resultados menos reproducibles, se recomienda usar muestras cristalinas y sin restos de componentes sanguíneos.

Procedimiento del ensayo

Notas:

a) Los componentes se testan específicamente para cada test. No mezcle componentes de diferentes lotes o de otros manufacturadores.

b) Todos los reactivos deben atemperarse a temperatura ambiente antes de usarlos. El diluyente de muestras y el diluyente del conjugado gelatinizan al ser refrigerados. Si fuera necesario acelerar la liquefacción, calentar estos componentes a 37ºC durante unos minutos.
Puede darse la formación de cristales de sal en la solución de lavado tamponada concentrada cuando se guarde a 2-8ºC. Estos cristales deben disolverse completamente calentando a 37ºC antes de usar la solución.

c) No realice el test en presencia de vapores reactivos (por ejemplo, sustancias alcalinas, ácidas o aldehídicas) o polvo, ya que la actividad enzimática de la HRP conjugada a la anti-IgM humana puede verse afectada.

d) No toque la parte superior de las tiras. No toque las paredes de los pocillos con las puntas cuando dispense los reactivos.

e) Use puntas de pipeta desechables. Evite la contaminación cruzada entre reactivos.

f) Golpee el vial suavemente sobre una superficie dura para que no quede líquido adherido a la tapa.

g) Evite la formación de burbujas en los pocillos.

h) Dispense los líquidos despacio para evitar que salgan como espray.

i) El control positivo y el control negativo deben pasarse conjuntamente con el suero a testar cada vez que el test se lleve a cabo.

j) Se debe dejar un pocillo en cada test como blanco, cada vez que se lleve a cabo el test.

k) Todos los procedimientos del ensayo deben llevarse a cabo secuencialmente sin interrupciones.

Procedimiento del ensayo - Manual
Protocolo de automatización disponible bajo petición

A) Lavado de las tiras

Se recomienda prelavar las tiras aunque no es obligatorio. En cualquier caso, las tiras deben ser humidificadas con solución de lavado antes de aplicar las muestras y deben ser secadas volcándolas sobre papel adsorbente, antes de realizar el test.

Si el proceso automático de lavado de la placa de ELISA no puede realizarse, debe seguirse el siguiente procedimiento:

1. Saque el número de tiras que necesite de su envoltura de aluminio y colóquelos en la estructura soporte de la placa.
2. Diluya la solución de lavado tamponada concentrada a 1:20 con agua destilada.
   Por ejemplo: para una tira prepare 100 ml de solución de lavado (5 ml de solución concentrada con 95 ml de agua destilada). Mezcle cuidadosamente durante 20 minutos.
   La solución de lavado debe preparase antes de ser usada y lo que sobre debe tirarse.
3. Tras la incubación, rellena cada pocillo hasta la mitad con solución de lavado.
4. Deje la solución dentro del pocillo durante unos dos minutos y luego elimínela de las tiras. Repita este paso **2** veces.
5. Seque la parte superior de las tiras y la estructura soporte volcándolas cuidadosamente sobre papel adsorbente.
   Complete el lavado de los pocillos tras la incubación para obtener mejores resultados. No deje restos de la solución de lavado en los pocillos.

B) Incubación de las muestras séricas y los controles

6. Diluya cada muestra de paciente a 1:105 con el diluyente de muestras siguiendo el siguiente esquema: añada 10 µl de suero de paciente a 200 µl de diluyente de muestras (1/21), después diluya más añadiendo 25 µl de la dilución 1/21 a 100 µl del diluyente de muestras.
   Nota: El diluyente de muestras contiene anti-IgG humana para quitar los anticuerpos IgG del suero humano.
7. Pipetee 50 µl del control positivo, del control negativo y de la dilución 1:105 del suero de paciente y dispénselo en los diferentes pocillos.
   Pipetee 50 µl del diluyente de muestras IgM en uno de los pocillos y dispénselo en el que vaya a considerar el blanco.
   El pipeteo de los controles y de las muestras séricas, no debe exceder los 10 minutos.
8. Cubra las tiras con una tapa para la placa e incúbelas durante 30 minutos a 37ºC en una cámara humidificadora.
9. Deseche el líquido de los pocillos. Lave los pocillos **5** veces y séquelos según el procedimiento indicado en los pasos A) 3-5.

C) Incubación con el conjugado

10. Dispense 50 µl de solución de conjugado de anti-IgM humana con HRP ya diluída sobre cada pocillo.
11. Cubra las tiras con una tapa para la placa e incúbelas durante 30 minutos a 37ºC en una cámara humidificadora.
12. Deseche el líquido de los pocillos. Lave los pocillos **5** veces y séquelos según el procedimiento indicado en los pasos A) 3-5.

D) Incubación con el sustrato TMB

13. Dispense 100 µl de sustrato TMB en cada pocillo.
14. Cubra las tiras con una tapa para la placa e incúbelas durante 15 minutos a temperatura ambiente.
15. Pare la reacción añadiendo 100 µl de solución de parada en cada pocillo.
    Dispense la solución de parada siguiendo la misma secuencia y los mismos intervalos de tiempo que como lo hizo al dispensar el sustrato TMB en el paso D 14.
16. Calibre el espectrofotómetro sobre el pocillo blanco. Determine la absorbancia a 450 nm y guarde los resultados.
    Se recomendaría realizar una determinación de la absorbancia inmediatamente pero no es obligatorio. La determinación de la absorbancia no debe exceder los 30 minutos ya que es lo que dura la reacción cromogénica.

Criterios de aceptabilidad

Un test realizado es válido si:

- La absorbancia del control positivo es ≥ 0,8 a 450 nm.
- La absorbancia del control negativo es ≤ 0,15 a 450 nm.

Si no se cumplen estas condiciones el test llevado a cabo no se considera válido y deberá ser repetido.

Cálculo del valor de Cut-Off (COV)

El valor de cut-off se calcula siguiendo la siguiente fórmula:

COV = 0,24 x (Pc – Nc) + Nc

Pc = Absorbancia del control positivo a 450 nm.
Nc = Absorbancia del control negativo a 450 nm.

Interpretación de los resultados del test

Absorbancia a 450 nm	Resultado	Interpretación de los resultados
Entre COV – 0,03	Negativo	No hay anticuerpos IgM detectables contra Chlamydia.
COV ± 0,03	Equívoco	Vuelva a testar las muestras séricas clasificadas como equívocas. Si los resultados equívocos se repiten, se recomienda analizar otra muestra.
Por encima de COV + 0,03	Positivo	Indica infección aguda y/o reciente por Chlamydia.

Limitaciones del ensayo

- Ningún test serológico debe usarse como único criterio diagnóstico. Todos los datos clínicos y de laboratorio deben tenerse en cuenta.
- El test de ELISA usa una única serovariedad (L_2). L_2 contiene determinantes antigénicos existentes en serovariedades de *Chlamydia trachomatis* así como en el grupo antigénico. Los anticuerpos anti-*Chlamydia psitacci*, *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) y *Acinetobacter calcoaceticus* deben detectarse por este ELISA.
- Este test no indicaría la ubicación de la infección por Chlamydia. No pretende reemplazar el aislamiento de células de cultivo, si éste está disponible.
- Como la infección con Chlamydia puede no causar ningún síntoma significativo inmediato, el estado agudo puede pasar desapercibido y podría haber anticuerpos IgM no detectables. Esto no excluye de la posibilidad de infección por Chlamydia.
- Los sueros contaminados por bacterias o hiperlipémicos podrían causar resultados erróneos.

Características del proceso

El test Chlamydia SeroELISA™ se comparó con el test Chlamydia TRUE-IgM™ IPAzyme™ (producto de Savyon Diagnostics, Cat. No. 012-01) que es un test serológico aceptado para la detección del anticuerpo IgM de Chlamydia.
El estudio poblacional incluye pacientes sospechosos de infección por Chlamydia así como individuos sanos (n = 162).

Comparación de SeroELISA™ con IPAzyme™

SeroELISA™ / IPAzyme™	Positivo	Negativo	Total
Positivo	76	4	80
Negativo	4	78	82
Total	80	82	162

Acuerdo general: (154/162) x 100 = 95,1%

Reacción cruzada

Los pacientes hospitalizados, infectados por *Neisseria gonorrea, Staphylococcus aureus* y *Peptostreptococcus anaerobius,* que fueron diagnosticados mediante kits serológicos comerciales, fueron también testados con el kit de Chlamydia SeroELISA. No se detectó ninguna reacción cruzada.

Bibliografía

1. **Yuan, Y., Zhang, Y. X., Watkins, N. G. and Caldwell, H.D.** (1989). Nucleotide and Deduced Amino Acid Sequences for the Four Variable Domains of the Major Outer Membrane Proteins of the 15 *Chlamydia trachomatis* Serovars. Infection and Immunity. **57:**1040-1049. Copyright 1989, American Society for Microbiology.
2. **Treharne J. D.** (1985). The community epidemiology of trachoma. Rev Infect Dis. **7:**760-763.
3. **Piura, B., Sarov, I., Sarov, B., Kleinman, D., Chaim, W. and Insler, V.** (1985). Serum IgG and IgA antibodies specific for *Chlamydia trachomatis* in salpingitis patients as determined by the immunoperoxidase assay. Eur. J. Epidemiol **1:** 110-116.
4. **Wang, S.P., Grayston, J.T., Kuo, C.C., Alexander, E.R., and Holmes, K.K.** (1977). SeroDiagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection with the microimmunofluorescence test. In: Nongonoccolcal urethritis and related infection, D. Hobson and K.K. Holmes (Eds), P. American Society for Microbiology, Washington DC. p. 237-248.
5. **Thompson III S. E., and Dretler R. H.** (1982). Epidemiology and Treatment of Chlamydial Infections in Pregnant Women and Infants. Review of Infectious Diseases **4:**S747
6. **Saikku P., Mattila, K., Nieminen, M.S., Huttunen, J.K., Leinonen, M., Ekman, M.R., Makela, P.H., and Valtonen, V**. (1988). Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infection. Lancet **II:** 983-986.
7. **Puolakkainen, M., Saikku, P., Leinonen, M., Nurminen, V., Vaananen, P. and Makela, P.H.** (1984). Chlamydia Pneumonitis and its Serodiagnosis in Infants. J. Infect. Dis. 149:598-604.
8. **Grayson, J.G.** (1989). Chlamydia pneumoniae, Strain TWAR. Chest 95:664-669.
9. **Gardner, P.S. Rapid Virus Diagnosis. In Voller, A., Bartlett, A. and Bidwell, D. (Eds).** Immunoassays for the 80s, pp. 353-360 MTP Press Limited 1981.
10. **Chantler, S. and Diment, J.A.** current Status of Specific IgM Antibody Assays. In Voller, A., Bartlett, A. and Bidwell, D. (Eds). Immunoassays for the 80s, pp. 417-430 MTP Press Limited 1981.
11. **Numazaki, K., Chiba, S., Yamanaka, T**., Moroboshi, T., Aoki, K., Nakao, T. (1985). Detection of IgM Antibodies against Chlamydia trachomatis by Enzyme Linked Fluorescence Immunoassay. J.Clin. Pathol. 38:733-739.

EC REP

Obelis s.a. (European Authorized Representative Center)
Boulevard Général Wahis 53, 1030 Brussels, Belgium
Tel.: +32.2.732.59.54 Fax.: +32.2.732.60.03
e-mail: mail@obelis.net